



DEMANDE INTERNATIONALE RELATIVE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/127, 7/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/18601 (43) Date de publication internationale: 13 juillet 1995 (13.07.95)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00012</p> <p>(22) Date de dépôt international: 5 janvier 1995 (05.01.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/00090 6 janvier 1994 (06.01.94) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ROUX, Didier [FR/FR]; 54, avenue Gambetta, F-33700 Mérignac (FR). DEGERT, Corinne [FR/FR]; 49, rue Claude-Debussy, Cerillan, F-33160 Saint-Médard-en-Jalles (FR). LAVER-SANNE, René [FR/FR]; 62, avenue du Parc-d'Espagne, F-33600 Pessac (FR).</p> <p>(74) Mandataires: LE GUEN, Gérard etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR PREPARING LIPOSOMES WITHOUT USING AN ORGANIC SOLVENT</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE LIPOSOMES SANS UTILISATION DE SOLVANT ORGANIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for preparing liposomes by (1) mixing together an aqueous solvent, a surfactant including a hydrophilic terminal and a C₂₋₁₆ hydrocarbon chain, a sterol and/or a membrane protein, and/or a product to be encapsulated, to dissolve the sterol and/or the product to be encapsulated; (2) mixing the resulting composition with a lipid surfactant to form a uniform lamellar liquid crystal phase or a liquid crystal phase suspension in water; and (3) converting the liquid crystal phase or liquid crystal phase suspension into liposomes.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un procédé de préparation de liposomes comprenant: 1) le mélange d'un solvant aqueux, d'un tensioactif comprenant une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonnée en C₂ à C₁₆, d'un stérol et/ou une protéine membranaire et/ou d'un produit à encapsuler de façon à obtenir une dissolution du stérol et/ou du produit à encapsuler; 2) le mélange de la composition ainsi obtenue avec un tensioactif lipidique de façon à former une phase cristal liquide lamellaire homogène ou une suspension de phase cristal liquide dans de l'eau; et 3) la transformation de la phase cristal liquide ou de la suspension de phase cristal liquide en liposomes.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Procédé de préparation de liposomes sans utilisation
de solvant organique.

La présente invention concerne un procédé de préparation de liposomes sans utilisation de solvant organique.

Les liposomes comprennent habituellement un tensioactif lipidique ainsi que du cholestérol et/ou un/des produit(s) actif(s) encapsulé(s). Le cholestérol (plus généralement un stérol) se lie avec le phospholipide pour améliorer les propriétés élastiques et d'imperméabilité de la membrane lipidique. Si le cholestérol ou le produit actif à encapsuler sont mélangés directement avec le lipide et le solvant aqueux, le mélange reste inhomogène. Par exemple, on peut observer que le cholestérol reste après plusieurs jours sous forme de petits cristaux qui ne se dissolvent pas dans la préparation même par adjonction d'un grand excès d'eau. Afin de pallier à ce problème on passe par un procédé dit "d'atomisation" (voir EP-A-87 993) qui comprend le mélange des différents constituants dans un solvant organique (généralement chloré tel que le chloroforme ou le dichlorométhane, le méthanol est aussi utilisé) avant leur utilisation en milieu aqueux. L'évaporation de ce solvant produit une poudre qui est ensuite utilisée directement dans le procédé de préparation des liposomes (voir par exemple EP-A-0 107 559). L'inconvénient de ce procédé est que le passage par l'atomisation peut laisser des traces (petites mais impossible à faire disparaître) de solvant dans la préparation finale. Compte tenu des effets nuisibles sur la santé de telles traces il est indispensable d'arriver à préparer des liposomes sans utiliser de solvant organique.

Des procédés semblables sont utilisés pour incorporer dans des liposomes des protéines membranaires, c'est-à-dire des protéines solubles dans les membranes

mais difficilement solubles dans l'eau.

La présente invention vise à fournir un procédé de préparation de liposomes permettant de se dispenser de l'étape d'atomisation. L'originalité du procédé repose sur l'utilisation d'un co-tensioactif bien
5 choisi qui permet de solubiliser le cholestérol ou le produit actif à encapsuler sans utiliser un solvant organique.

La présente invention a ainsi pour objet un
10 procédé de préparation de liposomes comprenant :

1) le mélange d'un solvant aqueux, d'un tensioactif comprenant une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonée en C_2 à C_{16} , d'un stérol et/ou une protéine membranaire et/ou d'un produit à encapsuler de façon à
15 obtenir une dissolution du stérol et/ou du produit à encapsuler;

2) le mélange de la composition ainsi obtenue avec un tensioactif lipidique de façon à former une phase cristal liquide lamellaire homogène ou une suspension de
20 phase cristal liquide dans de l'eau, et

3) la transformation de la phase cristal liquide ou de la suspension de phase cristal liquide en liposomes.

Il est à noter que dans certains cas la
25 transformation de la phase cristal liquide en liposomes se produit spontanément.

La taille des liposomes spontanés est typiquement de 100 à 500 nm plus généralement de 50 à 5000 nm. Les liposomes spontanés obtenus sont des liposomes multilamellaires comportant généralement de 10 à
30 10000 couches alternées d'eau et de tensioactifs (à titre hydrophile et lipophiles) y compris au coeur des liposomes.

Mais l'invention a également pour objet la
35 phase cristal liquide ou la suspension de phase cristal

liquide obtenue au deuxième stade.

On décrira maintenant de façon plus détaillée la présente invention.

Le tensioactif utilisé au premier stade
5 comprend une chaîne carbonée en C_2 à C_{16} , ramifiée ou non
et de préférence en C_6 à C_{14} .

La tête hydrophile est généralement un alcool
ou un alcool éthoxylé mais peut être aussi un acide
carboxylique ou un sel d'acide gras, un ammonium quater-
10 naire, un sulfonate ou un sulfate ou tout autre groupe-
ment ionique ou non ionique polaire.

Dans le premier stade, le solvant aqueux, le
tensioactif et le cholestérol et/ou une protéine membra-
naire et/ou le produit à encapsuler sont mélangés en
15 proportions adéquates. Généralement, le tensioactif est
utilisé en une proportion de 1 à 50 % en poids, de préfé-
rence de 5 à 25 % et le cholestérol en une proportion de
0 % à 25 % en poids. Après agitation, généralement le
mélange est laissé 1 à 2 heures au repos. On peut dans
20 certains cas solubiliser le cholestérol dans ce mélange
avec ou sans chauffage (40 à 100° Celsius) et agitation.
Cette solubilisation peut durer de quelques heures à
quelques jours. Il est possible de solubiliser aussi dans
certains cas d'abord le cholestérol dans le tensioactif
25 lorsqu'il est liquide (alcool, alcool éthoxylé, etc...) puis d'ajouter le solvant aqueux.

Dans le deuxième stade, le tensioactif
lipidique est ajouté à la composition obtenue au premier
stade en proportion nécessaire pour la formation d'une
30 phase cristal liquide ou d'une suspension de phase
cristal liquide dans l'eau. Typiquement on ajoute de 1
à 50 %, de préférence de 5 à 25 % en poids de tensioactif
lipidique. De préférence, le tensioactif lipidique est
ajouté en une quantité supérieure à celle du tensioactif
35 utilisé au premier stade. Le tensioactif lipidique est

choisi parmi ceux classiquement utilisés pour la fabrication des liposomes et est généralement un phospholipide. Généralement le mélange est agité doucement pendant 5 à 48 heures. Si nécessaire on peut le porter à une température plus élevée de l'ordre de 60-80° Celsius afin d'accélérer le processus de dissolution. Puis le mélange est ramené à température ambiante. Dans certains cas, on peut ajouter le produit à encapsuler à ce moment, juste avant d'ajouter le tensioactif lipidique.

On obtient ainsi une phase cristal liquide lamellaire homogène ou une suspension de phase cristal liquide dans un excès d'eau. L'ensemble du cholestérol et/ou du produit actif à encapsuler ont été solubilisés. On peut alors utiliser cette pâte pour préparer des liposomes selon une méthode classique (ultrasonication, extrusion) ou par cisaillement constant selon le procédé décrit dans FR-A 2 689 418.

Comme indiqué précédemment, dans certains cas, on obtient la formation de sphérulites spontanées sans le besoin d'étapes supplémentaires. Ces sphérulites peuvent être facilement caractérisées par microscopie optique à contraste de phase ou ordinaire lorsque leur taille est suffisamment importante et/ou par cryofracture et microscopie électronique. Lorsque le dosage conduit à la formation de sphérulites spontanées, la crème obtenue après le second stade peut être diluée directement dans une solution aqueuse et les liposomes initialement empilés de façon compacte se séparent et restent en suspension diluée. Lorsqu'un produit actif a été incorporé lors de la première étape, celui-ci se retrouve à l'intérieur des liposomes.

Il est à noter que par ailleurs on peut disperser les liposomes obtenus dans une phase huileuse. Dans ce cas, la dispersion est homogène après une

agitation de quelques minutes. Cependant, au bout de quelques heures, les liposomes finissent par décanter mais peuvent être remis en suspension par simple agitation. La phase huileuse que l'on peut utiliser peut être
5 entre autres une huile minérale ou une huile végétale.

Le procédé selon l'invention permet d'incorporer une substance active du point de vue pharmaceutique ou cosmétique, substance qui peut être incorporée suivant sa nature, soit dans les parties aqueuses, soit dans les
10 parties formées par les tensioactifs.

A titre d'exemples de substances actives, on peut citer :

- dihydroxyacétone (DHA),
- alpha hydroxy acides (acide de fruits) et plus spécifiquement acides glycoliques, lactiques, tartriques,
15 salicyliques,
- filtres solaires hydrosolubles et liposolubles,
- huiles essentielles,
- composés insaponifiables,
- 20 - hyaluronate de sodium,
- TiO_2 micronisé,
- céramides,
- caféine,
- vitamines A, E et C.

25

Les exemples suivants illustrent la présente invention.

EXEMPLE 1

1,5 g de pentaoxyethylene lauryl éther
30 (C_{12}E_5) de la société NIKKOL est dissous dans 7g d'eau.
On ajoute 0,14 g de cholestérol (MERCK). On mélange et l'on peut clairement voir avec les yeux et sous microscope optique les cristaux de cholestérol non dissous. On porte le mélange à 80° pendant 12 heures afin d'obtenir
35 une complète dissolution du cholestérol dans le mélange

eau/C12E5. On peut éventuellement agiter de temps en temps le mélange ou de façon permanente, le temps de dissolution du cholestérol est alors réduit. Le mélange homogène obtenu est ramené à température ambiante. On
5 ajoute alors 1,35 g de lécithine de soja (SIGMA) puis on mélange et après 12 h d'attente on obtient une phase cristal liquide lamellaire homogène.

On peut vérifier soit par microscopie optique après dilution soit par cryofracture et microscopie
10 électronique sur la crème pure que le mélange est constitué de liposomes concentrés de rayon d'environ 200 à 500 nm. On peut afin d'améliorer l'homogénéité en taille, traiter directement le mélange obtenu (avant dilution) selon le procédé décrit dans FR-A-2 689 418.

15 EXEMPLE 2

On opère comme à l'exemple précédent en suivant le même ordre mais avec les proportions suivantes:

20 2,5 g de C12E5
2,1 g de lécithine
0,4 g de cholestérol
5 g d'eau.

On obtient spontanément des liposomes à l'issue du deuxième stade.

25 EXEMPLE 3

On opère comme à l'exemple 1 mais avec les proportions suivantes :

30 0,5 g de C12E5
2,5 g de lécithine de soja
0,25 g de cholestérol
6,75 g d'eau.

Il est cependant nécessaire d'attendre au moins 24 h à 60' pour obtenir un mélange homogène d'eau, de C12E5 et de cholestérol.

35 On obtient spontanément des liposomes à

l'issue du deuxième stade.

EXEMPLE 4

On opère comme à l'exemple 1, mais on remplace le C12E5 de la société NIKKOL par du LAUROPAL de la société WITCO (constitué principalement de C12E5) et en utilisant les proportions suivantes :

1,1 g de LAUROPAL 0205
1,9 g de lécithine de soja
0,2 g de cholestérol
6,8 g d'eau

ou

0,4 g de LAUROPAL 0205
2,6 g de lécithine de soja
0,25 g de cholestérol
6,8 g d'eau.

EXEMPLE 5

On opère comme à l'exemple 1 mais en utilisant un autre tensioactif non-ionique : LAUROPAL 4 de la société WITCO (constitué principalement de C12E4) et les proportions suivantes :

1,5 g de LAUROPAL 4
2,5 g de lécithine de soja
0,25 g de cholestérol
6 g d'eau

ou

0,7 g de LAUROPAL 4
3,3 g de lécithine de soja
0,33 g de cholestérol
6 g d'eau.

EXEMPLE 6

On opère comme à l'exemple 1 en utilisant un autre tensioactif non-ionique : REMCOPAL 121 de la société CECA (constitué principalement de C12E3) et les proportions suivantes :

0,7 g de REMCOPAL 121

3 g de lécithine de soja
0,33 g de cholestérol
6 g d'eau

ou

5 0,5 g de REMCOPAL 121
3 g de lécithine de soja
0,35 g de cholestérol
6 g d'eau.

EXEMPLE 7

10 On opère comme à l'exemple 1 en utilisant :
1 g d'oléate de potassium (Aldrich)
3 g de lécithine de soja
0,3 g de cholestérol
6 g d'eau

15 ou

0,5 g d'oléate de potassium
3,5 g de lécithine de soja
0,35 g de cholestérol
6 g d'eau.

20 EXEMPLE 8

On incorpore dans l'eau de préparation de l'exemple 4 (deuxième composition) une concentration de 10^{-3} molaire de calcéine. On peut après préparation vérifier que la sonde fluorescente (calcéine) a bien été
25 incorporée en mesurant la cinétique de déclin de fluorescence par extinction avec du cobalt.

EXEMPLE 9

On met dans un erlen 2,5 g de Remcopal 121
30 (CECA) et 0,8 g de cholestérol (Aldrich). On ajoute 4 g d'eau, mélange puis laisse reposer pendant 2 à 3 heures à 65° C jusqu'à dissolution complète du cholestérol, on laisse refroidir à température ambiante. On ajoute 10 g de lécithine Phospholipon 90P (Nattermann), on mélange
35 pendant quelques minutes, ajoute goutte à goutte 8,5 g

d'une solution aqueuse contenant 40 % en poids de DHA (Merck) et ajuste à pH3 avec de l'acide chlorhydrique. On mélange intimement afin d'obtenir une pâte homogène et laisse reposer 24 h à température ambiante.

5 On peut ensuite diluer cette pâte dans de l'eau pour obtenir une suspension homogène de capsules contenant la DHA. On ajuste ensuite le pH à pH = 5, ce qui permet d'avoir une formulation externe des capsules à ce pH tout en gardant la DHA dans les capsules à un pH
10 plus acide. Des mesures de pH et des dosages en fonction du temps permettent de vérifier que la dégradation de la DHA est ralentie lorsque celle-ci est microencapsulée par rapport à une solution aqueuse simple.

15

EXEMPLE 10

On met dans un erlen 2,5 g de Remcopal 121 et 0,8 g de cholestérol. On ajoute 4 g d'eau, mélange puis laisse reposer pendant 2 à 3 heures à 65° C jusqu'à dissolution complète du cholestérol. On laisse refroidir
20 à température ambiante. On ajoute 10 g de lécithine Phospholipon 90P et 1 g d'acide salicylique (Aldrich). On mélange pendant quelques minutes, ajoute goutte à goutte 7 g d'une solution aqueuse contenant 42 mg de parahydroxybenzoate de méthyle sodés, 89 mg de paraphy-
25 droxybenzoate de propyle sodés et 127 mg de 2-phénoxy éthanol (Aldrich). On mélange pendant quelques minutes et laisse reposer 24 h à 37° C. Cette pâte homogène peut ensuite être dispersée dans de l'eau pour former des liposomes multilamellaires contenant l'acide salicylique.
30 Une séparation par centrifugation puis un dosage permet de montrer que plus de 70 % de l'acide est contenu dans les capsules. L'ajout d'un indicateur coloré à la préparation permet de montrer en effectuant un dosage acido-basique que l'intérieur des capsules est à un pH
35 de 2 unités de pH environ plus faible que l'extérieur.

EXEMPLE 11

On met dans un erlen 2,5 g de Remcopal 121 et 0,8 g de cholestérol. On ajoute 4 g d'eau, mélange puis laisse reposer pendant 2 à 3 heures à 65° C jusqu'à dissolution complète du cholestérol, laisse refroidir à température ambiante. On ajoute 10 g de lécithine Phospholipon 90P. On mélange pendant quelques minutes, ajoute goutte à goutte 8,5 g d'une solution aqueuse contenant 1 % de hyaluronate de sodium (Laboratoire Bomann). On laisse reposer 24 h. On peut disperser ce mélange dans de l'eau afin d'obtenir une suspension aqueuse de capsules contenant le hyaluronate de sodium.

On peut également disperser le mélange dans de l'huile de ricin et obtenir une suspension homogène de capsules qui peut être utilisée dans des préparations futures. Cependant, au bout de quelques heures les capsules décantent mais peuvent être remises en suspension par simple agitation.

EXEMPLE 12 (filtre solaire soluble dans l'eau).

On prépare une phase aqueuse contenant 10 % d'Eusolex 232 (Merck) : phase A.

On met dans un erlen 2,3 g de Remcopal 121 et 0,8 g de cholestérol, ajoute 4 g d'eau, on mélange puis laisse reposer pendant 2 à 3 heures à 65° C jusqu'à dissolution complète du cholestérol, on laisse refroidir à température ambiante. On ajoute 11,3 g de lécithine Phospholipon 25P (Nattermann). On mélange pendant quelques minutes, ajoute goutte à goutte 7 g de phase A. On laisse reposer 24 h. La préparation peut être dispersée dans de l'eau ou de l'huile afin d'obtenir une suspension de capsules contenant le filtre solaire.

EXEMPLE 13 (filtre solaire soluble dans l'huile).

On met dans un erlen 6 g de Remcopal 121 et 1,5 g de cholestérol, ajoute 8 g d'eau, on mélange puis
5 laisse reposer pendant 2 à 3 heures à 65° C jusqu'à dissolution complète du cholestérol. On laisse refroidir à température ambiante. On ajoute 18 g de lécithine Phospholipon 25P. On ajoute 6 g de méthoxycinnamate, mélange pendant quelques minutes, ajoute goutte à goutte
10 16 g d'eau. On laisse reposer 24 h, la préparation peut être dispersée dans de l'eau afin d'obtenir une suspension de capsules contenant le filtre solaire.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de liposomes comprenant :

5 1) le mélange d'un solvant aqueux, d'un tensioactif comprenant une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonée en C_2 à C_{16} , d'un stérol et/ou une protéine membranaire et/ou d'un produit à encapsuler de façon à obtenir une dissolution du stérol et/ou du produit à encapsuler;

10 2) le mélange de la composition ainsi obtenue avec un tensioactif lipidique de façon à former une phase cristal liquide lamellaire homogène ou une suspension de phase cristal liquide dans de l'eau, et

15 3) la transformation de la phase cristal liquide ou de la suspension de phase cristal liquide en liposomes.

2. Procédé de préparation de liposomes selon la revendication, dans lequel le tensioactif utilisé au premier stade a une chaîne hydrocarbonée en C_6 à C_{14} .

20 3. Procédé de préparation de liposomes selon la revendication 1 ou 2, dans lequel au premier stade on utilise un mélange comprenant 1 à 50 % en poids de tensioactif et 0 à 25 % en poids de cholestérol.

25 4. Procédé de préparation de liposomes selon la revendication 3, dans lequel au premier stade on utilise un mélange comprenant 5 à 25 % en poids de tensioactif.

30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel au deuxième stade on ajoute 1 à 50 % en poids de tensioactif lipidique.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel au deuxième stade on ajoute 5 à 25 % en poids de tensioactif lipidique.

35 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le tensioactif

lipidique est ajouté en une quantité supérieure à celle du tensioactif utilisé au premier stade.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les liposomes obtenus sont dispersés dans une phase huileuse.

9. Procédé de préparation d'une phase cristal liquide ou d'une suspension de phase cristal liquide qui comprend :

1) le mélange d'un solvant aqueux, d'un tensioactif comprenant une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonée en C_2 à C_{16} , d'un stérol et/ou une protéine membranaire et/ou d'un produit à encapsuler de façon à obtenir une dissolution du stérol et/ou du produit à encapsuler;

2) le mélange de la composition ainsi obtenue avec un tensioactif lipidique de façon à former une phase cristal liquide lamellaire homogène ou une suspension de phase cristal liquide dans de l'eau.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/00012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61K9/127 A61K7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 299 937 (LARSSON) 18 January 1989 see column 7; example 4 ---	1-7,9
Y	WO,A,91 04013 (MICROVESICULAR SYSTEMS, INC) 4 April 1991 see page 19 - page 21; example 1 ---	1-7,9
Y	WO,A,90 00399 (SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION) 25 January 1990 see page 193; example 164 ---	1-7,9
Y	WO,A,88 06882 (MICRO VESICULAR SYSTEMS, INC.) 22 September 1988 see the whole document see page 11, line 1 - line 7 ---	1-7,9

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 1995

Date of mailing of the international search report

28.04.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/FR 95/00012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 220 797 (NIKKO CHEMICALS CO. LTD.) 6 May 1987 see page 7; example 10 ---	1-7,9
A	WO,A,93 19735 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 14 October 1993	
A	& FR,A,2 689 418 (CNRS) cited in the application ---	
A	DATABASE WPI Week 9312 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-096927 & JP,A,05 039 484 (KOSE KK) , 19 February 1993 see abstract -----	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0299937	18-01-89	SE-C- 457933	08-06-89
		JP-A- 1061421	08-03-89
		SE-B- 8457933	13-02-89

WO-A-9104013	04-04-91	AU-A- 6524990	18-04-91
		US-A- 5234767	10-08-93

WO-A-9000399	25-01-90	AU-A- 3964489	05-02-90
		EP-A- 0352000	24-01-90
		JP-T- 3505875	19-12-91
		PT-B- 91099	31-01-95

WO-A-8806882	22-09-88	US-A- 4917951	17-04-90
		AU-B- 605581	17-01-91
		AU-A- 1541688	10-10-88
		AU-B- 603659	22-11-90
		AU-A- 1543888	10-10-88
		AU-B- 603447	15-11-90
		AU-A- 1683688	10-10-88
		DE-A- 3866544	09-01-92
		DE-A- 3867635	20-02-92
		DE-A- 3867637	20-02-92
		EP-A, B 0349579	10-01-90
		EP-A, B 0352282	31-01-90
		EP-A, B 0349593	10-01-90
		JP-T- 2502794	06-09-90
		JP-T- 2502094	12-07-90
		JP-B- 6000193	05-01-94
		JP-T- 2503646	01-11-90
		US-A- 4855090	08-08-89
		WO-A- 8806881	22-09-88
		WO-A- 8806883	22-09-88
		US-A- 4911928	27-03-90
		US-A- 4942038	17-07-90
		US-A- 5023086	11-06-91
		US-A- 5000960	19-03-91
		US-A- 5219538	15-06-93
		US-A- 5234767	10-08-93
		ZA-A- 8801763	12-09-88
		US-A- 5147723	15-09-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/FR 95/00012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0220797	06-05-87	JP-A- 62095134	01-05-87
WO-A-9319735	14-10-93	FR-A- 2689418	08-10-93
		CA-A- 2133421	14-10-93
		EP-A- 0633768	18-01-95

PCT/FR 95/00012

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSULTÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 220 797 (NIKKO CHEMICALS CO. LTD.) 6 Mai 1987 voir page 7; exemple 10 ---	1-7,9
A	WO,A,93 19735 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 14 Octobre 1993	
A	& FR,A,2 689 418 (CNRS) cité dans la demande ---	
A	DATABASE WPI Week 9312 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-096927 & JP,A,05 039 484 (KOSE KK) , 19 Février 1993 voir abrégé -----	9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 95/00012

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0299937	18-01-89	SE-C- 457933	08-06-89
		JP-A- 1061421	08-03-89
		SE-B- 8457933	13-02-89

WO-A-9104013	04-04-91	AU-A- 6524990	18-04-91
		US-A- 5234767	10-08-93

WO-A-9000399	25-01-90	AU-A- 3964489	05-02-90
		EP-A- 0352000	24-01-90
		JP-T- 3505875	19-12-91
		PT-B- 91099	31-01-95

WO-A-8806882	22-09-88	US-A- 4917951	17-04-90
		AU-B- 605581	17-01-91
		AU-A- 1541688	10-10-88
		AU-B- 603659	22-11-90
		AU-A- 1543888	10-10-88
		AU-B- 603447	15-11-90
		AU-A- 1683688	10-10-88
		DE-A- 3866544	09-01-92
		DE-A- 3867635	20-02-92
		DE-A- 3867637	20-02-92
		EP-A, B 0349579	10-01-90
		EP-A, B 0352282	31-01-90
		EP-A, B 0349593	10-01-90
		JP-T- 2502794	06-09-90
		JP-T- 2502094	12-07-90
		JP-B- 6000193	05-01-94
		JP-T- 2503646	01-11-90
		US-A- 4855090	08-08-89
		WO-A- 8806881	22-09-88
		WO-A- 8806883	22-09-88
		US-A- 4911928	27-03-90
		US-A- 4942038	17-07-90
		US-A- 5023086	11-06-91
		US-A- 5000960	19-03-91
		US-A- 5219538	15-06-93
		US-A- 5234767	10-08-93
		ZA-A- 8801763	12-09-88
		US-A- 5147723	15-09-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 95/00012

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0220797	06-05-87	JP-A- 62095134	01-05-87
WO-A-9319735	14-10-93	FR-A- 2689418	08-10-93
		CA-A- 2133421	14-10-93
		EP-A- 0633768	18-01-95